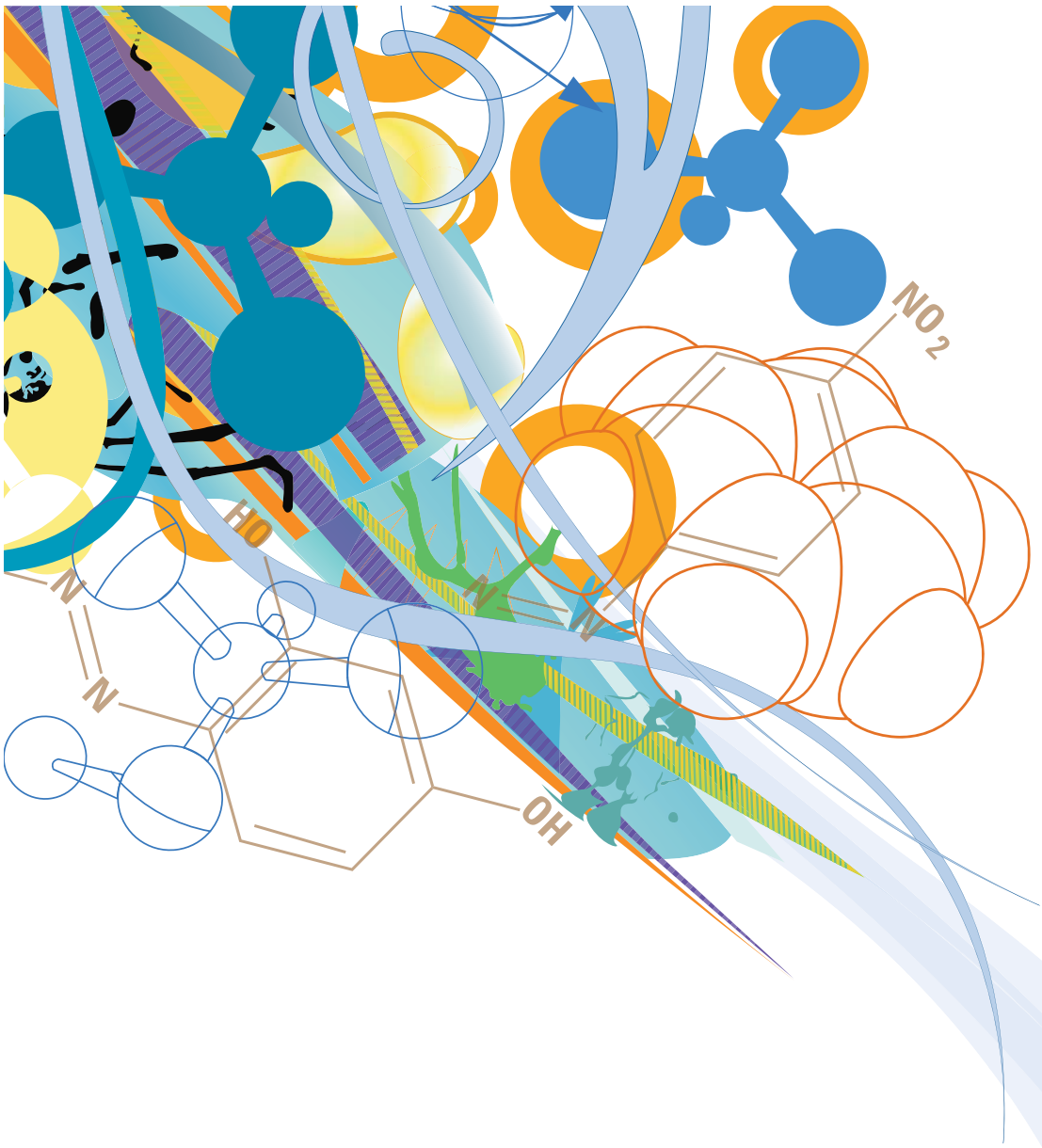


Opinioni emergenti: Agilent e la metabolomica

The Measure of Confidence

Agilent Technologies

Informazioni sui metaboliti

Un metodo efficace per studiarne fisiologia, funzione e identità

Cos'è la metabolomica?

La metabolomica è lo studio del contenuto in metaboliti di una cellula o di un campione. Gli studi della metabolomica consentono di eseguire ricerche per visualizzare i sistemi biologici in modo diverso ma complementare agli studi di genomica, trascrittomica e proteomica, consentendo di autenticare e validare i campioni. Si tratta di una disciplina nuova e potente, che apre una vasta gamma di applicazioni, nella ricerca di base e clinica, nello sviluppo dei farmaci, in tossicologia ambientale, nell'ottimizzazione delle colture e nella scienza alimentare.

Cosa sono i metaboliti?

I metaboliti, piccole molecole organiche, sono importanti modulatori, substrati, prodotti secondari ed elementi base di diversi processi biologici. Per questo motivo, la presenza o assenza di metaboliti specifici in una cellula o in un campione fornisce informazioni importanti sullo stato fisiologico e funzionale del sistema biologico o del campione. L'accumulo di un metabolita specifico può indicare la presenza di un problema in una via metabolica, l'attivazione di una via di risposta a un segnale o l'ottimizzazione di una via biosintetica.

Agilent collabora con i più importanti ricercatori del settore della metabolomica, scienziati impegnati nello sviluppo di strumenti e tecniche per la ricerca metabolomica di nuova generazione. Tali studi vengono poi implementati in soluzioni efficaci che semplificano la ricerca del settore. È così che nasce la completa gamma di strumenti GC-MS e LC-MS in grado di garantire ottime prestazioni e affidabilità tipiche di Agilent per eseguire analisi metabolomiche rapide e di elevata qualità. Ogni strumento utilizza lo stesso software di analisi dei dati garantendo a tutti gli utenti un'esperienza comune nella gestione di esperimenti che richiedono spettrometri di massa diversamente configurati. Inoltre, i dati elaborati possono essere analizzati tramite il software Mass Profiler Professional (MPP), un efficace strumento di analisi statistica e visualizzazione dei dati da cui è possibile individuare ed estrarre risultati significativi.

Agilent supporta la ricerca in campo metabolomico per diverse applicazioni

Agilent offre ai ricercatori una gamma completa di reagenti, colonne, strumenti e software a supporto degli esperimenti in ambito metabolomico adatta a numerose applicazioni tra cui:

- Ricerca di base e clinica: identificazione e validazione di marker metabolici che correlati con determinate patologie consentono fondamentali approfondimenti in campo biologico.
- Agricoltura: identificazione e studio di vie metaboliche per ottimizzare lo sviluppo delle colture, l'aumento della resa del raccolto e la resistenza a pesticidi/erbicidi.
- Alimentazione/Nutrizione: identificazione della presenza o assenza di metaboliti associati a fattori principali come qualità del cibo, genuinità, gusto e valore nutrizionale, nonché supporto nello sviluppo di nutraceutici.
- Industria farmaceutica: identificazione di metaboliti e marker di tossicità per la creazione e lo sviluppo di farmaci.
- Ambiente: identificazione di metaboliti connessi agli effetti delle sostanze chimiche e altri fattori di stress di un sistema biologico, presenti nell'ambiente.
- Biocombustibili: identificazione di profili metabolici per migliorare i processi di fermentazione e la produzione di biocombustibili.

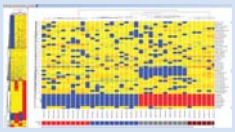
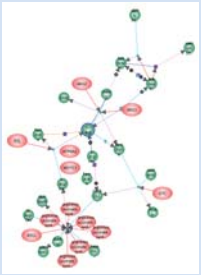
> "...siamo in grado di misurare, in metabolomica, l'intero complesso di piccole molecole di un campione biologico. Ciò ci consente di ottenere un'immagine a livello biochimico dello stato fisiologico dell'organismo o del campione al momento del prelievo, nonché dell'attuale stato funzionale della cellula in modo molto diverso dai punti di vista forniti da proteomica, trascrittomica e genomica."
>
> — Chris Beecher, Ph.D.,
> Ricercatore,
> Università del Michigan

Il potere della metabolomica

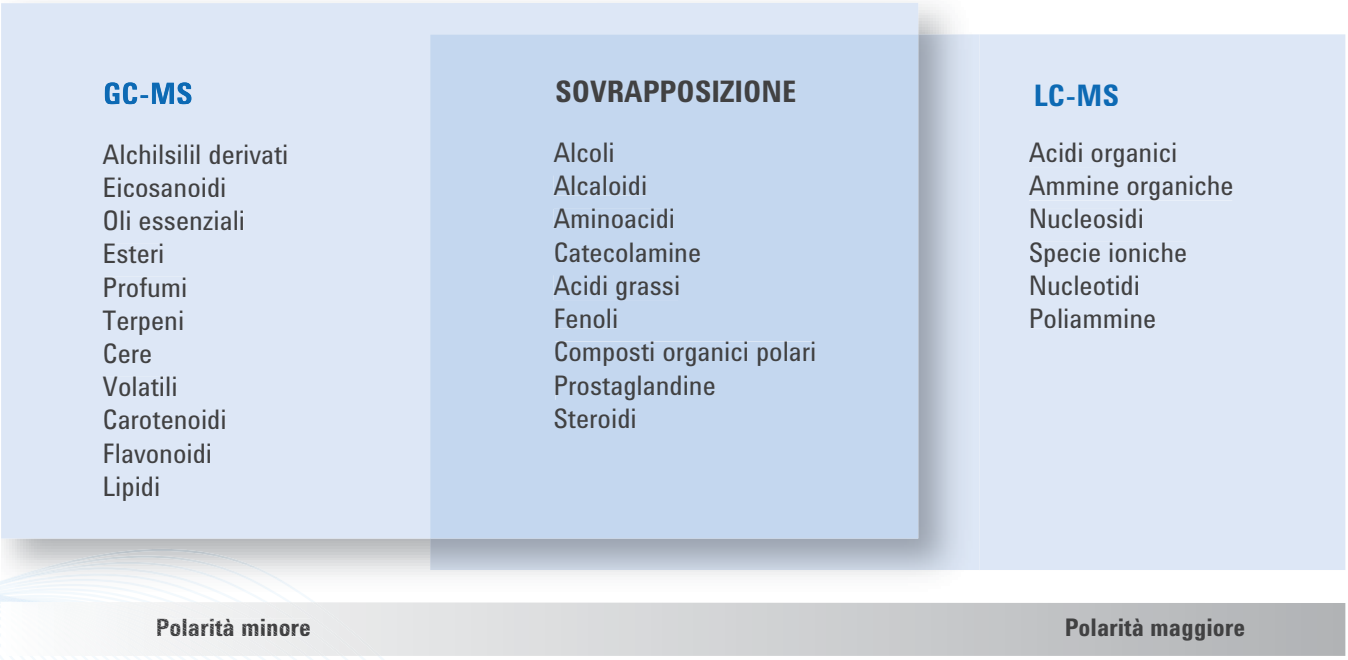
Agilent mette a disposizione un team di scienziati estremamente competenti e una gamma di strumenti adatti per questo settore al fine di ottenere e analizzare in modo rapido e sicuro i dati ottenuti, indipendentemente che si tratti di studi metabolomici di screening o mirati.

Metabolomica esplorativa

Gli esperimenti di metabolomica esplorativa implicano l'esame di una serie di metaboliti non target, cercando quelli con variazioni statisticamente significative della loro abbondanza all'interno di un insieme di campioni sperimentali paragonati a campioni di controllo, determinandone inoltre la struttura chimica. La fase di interpretazione consente al ricercatore di collegare il metabolita alla condizione fisiologica o al processo biologico.

	Separazione e rivelazione	Quantificazione e ricerca delle caratteristiche	Allineamento e analisi statistica	Identificazione	Analisi del percorso metabolico
		Software MassHunter	Software MPP		
GC-MS			 Analisi e visualizzazione	Identificazione del composto	 Visualizzazione del percorso metabolico
LC-MS					

Soluzioni Agilent per la scoperta metabolomica esplorativa



Classi chimiche compatibili con GC-MS rispetto a LC-MS

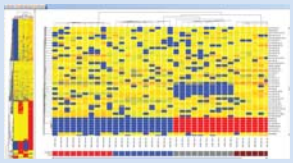
Agilent ti aiuta a superare le sfide nel campo della ricerca metabolomica:

- Tracciatura riproducibile delle sostanze incognite da un campione all'altro con sistemi MS che forniscono una misura della massa e del tempo di ritenzione altamente riproducibile.
- Misura accurata delle abbondanze in ogni campione offrendo un paragone affidabile della quantità di metaboliti nei casi in cui non è possibile utilizzare gli standard.
- Ricerca delle caratteristiche di interesse con strumenti che consentono di revisionare e modificare i risultati ottenuti: AMDIS (GC-MS) o MassHunter Molecular Feature Extractor (LC-MS).
- Identificazione dei composti sconosciuti utilizzando i database integrati in MassHunter: Libreria metabolomica Agilent Fiehn GC-MS RTL e database di composti MPP METLIN Personal e libreria spettrale MS-MS.
- Analisi e confronto efficace di diversi campioni con strumenti di visualizzazione e analisi statistica semplici o avanzati disponibili nei software MPP. MPP analizza sia i dati GC-MS che LC-MS.
- Valutazione dei dati MS nel contesto biologico utilizzando il modulo opzionale MPP di analisi delle vie metaboliche.

Per quanto riguarda gli studi di ricerca metabolomica esplorativa, i sistemi Agilent GC-MS (singolo quadrupolo) e LC-MS (TOF e Q-TOF) sono progettati per ottenere dati di elevata qualità, con la riproducibilità richiesta su ampio set di campioni.

Studi mirati in metabolomica

Gli esperimenti in metabolomica mirata si focalizzano su analisi di conferma, utilizzando un elevato numero di campioni per misurare accuratamente l'abbondanza dei metaboliti identificati in precedenza. Tali esperimenti sono altamente quantitativi e solitamente richiedono l'uso di standard analitici.

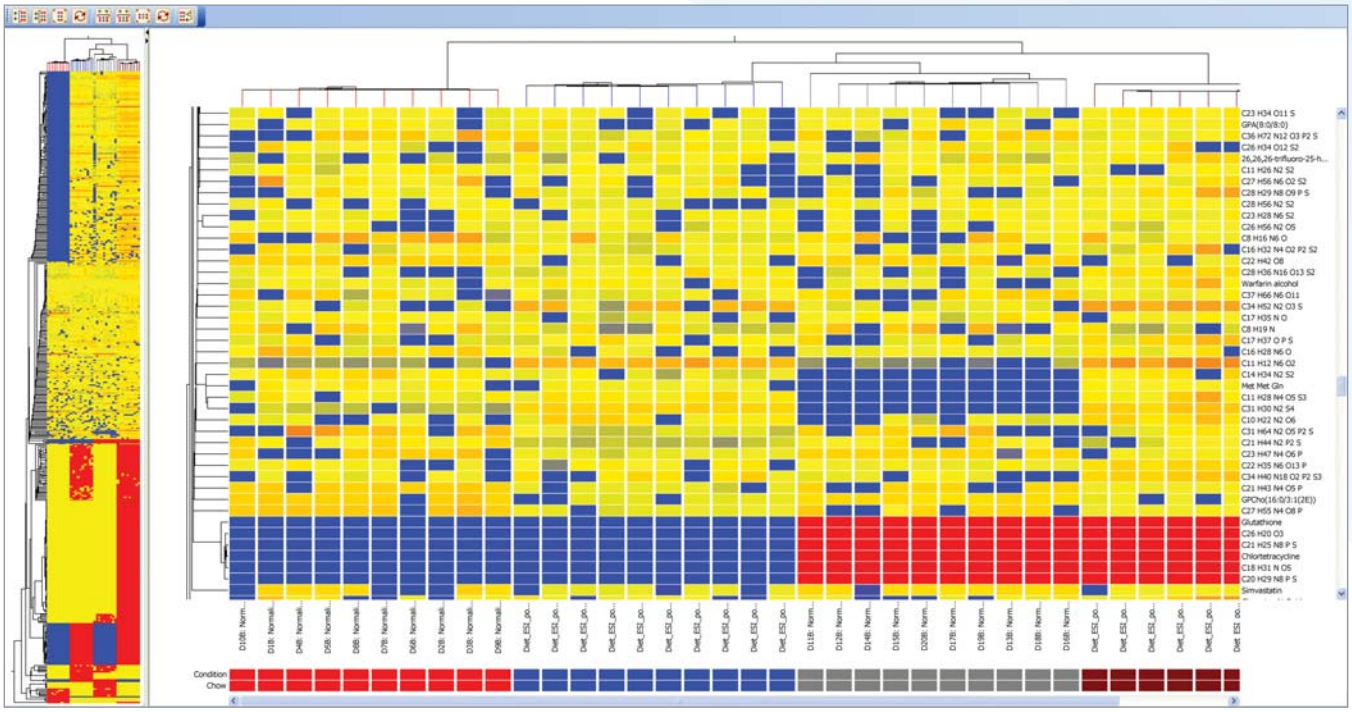
	Separazione e rivelazione	Quantificazione MRM	Analisi statistiche	Analisi delle vie metaboliche
		Software MassHunter	Software MPP	
GC-MS		Identificazione del composto	 Analisi e visualizzazione	Visualizzazione delle vie metaboliche
LC-MS				

Soluzioni Agilent per la ricerca mirata metabolomica

Agilent ti aiuta a superare le sfide nel campo della ricerca mirata metabolomica:

- Rivela gli analiti target a bassa concentrazione, anche in presenza di metaboliti ad alta concentrazione con i sistemi MS Agilent che offrono un'elevata sensibilità in un ampio range dinamico.
- Mantiene coefficienti di variazione (CV) bassi, consentendo analisi quantitative affidabili su ampie serie di campioni.
- Processa in modo rapido ed efficiente ampie serie di campioni con sistemi MS in grado di fornire elevate velocità di iniezione per restare al passo dei sistemi cromatografici rapidi ed efficaci, aumentando la produttività.
- Revisiona in tutta semplicità i metodi e i dati per consentire l'elaborazione di lotti di ampie serie di campioni.
- Analizza e confronta in modo efficace diversi campioni con strumenti di visualizzazione e analisi statistica semplici o avanzati disponibili nei software MPP e convalida nuovamente le vie proposte dagli studi di scoperta metabolomica.

Per quanto riguarda gli studi in metabolomica mirata, i sistemi Agilent GC-MS e LC-MS triplo quadrupolo forniscono un rilevamento sensibile in un ampio range dinamico e offrono la riproducibilità e l'efficacia necessarie per gestire ampie serie di campioni. Insieme ai report di analisi della qualità di MassHunter e agli strumenti di visualizzazione e analisi MPP, le soluzioni metabolomiche mirate di Agilent offrono una produttività mai vista prima per ampi lotti con composti multipli.



Il software MPP consente di identificare le correlazioni nei dati attraverso numerosi metodi di clustering tra cui anche quello gerarchico (mostrato in figura). Questo tipo di clustering collega profili di abbondanza simili in gruppo all'interno di una struttura ad albero. Il dendrogramma mostra le relazioni tra le entità di massa in una dimensione e tra i campioni nell'altra dimensione. In questo esempio, i vari tipi di dieta per i ratti con diversi integratori di fibre mostrano le somiglianze nei profili di abbondanza per i campioni replicati.

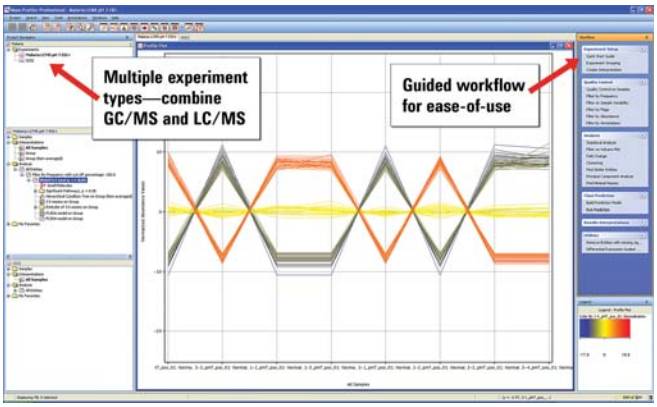
Il software viene personalizzato in base alle esigenze dell'utilizzatore in materia di ricerca metabolomica

È possibile analizzare i dati utilizzando lo stesso pacchetto software Mass Profiler Professional (MPP), indipendentemente che si tratti di ricerche in metabolomica esplorativa o analisi mirate.

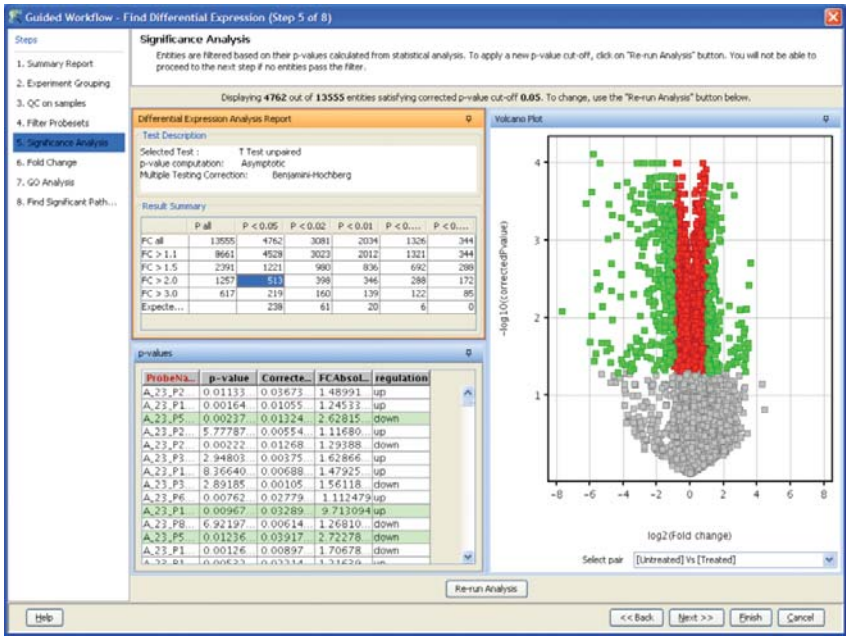
Con il software MPP, è possibile confrontare e visualizzare i dati provenienti da ampie serie di campioni per consentire una rapida individuazione di marker biologici di metaboliti ed eseguire un'analisi dei metadati per agevolare l'individuazione delle relazioni negli esperimenti più complessi. È inoltre possibile normalizzare, allineare e confrontare i dati ottenuti da diversi strumenti, una funzione fondamentale per i laboratori che eseguono più esperimenti di metabolomica.

Il software MPP semplifica l'identificazione delle differenze significative nel tipo e nella quantità relativa di metaboliti presenti nei diversi campioni, nonché la capacità di posizionare i dati in un contesto biologico. È possibile identificare le differenze statisticamente rilevanti utilizzando ANOVA, PCA, clustering, diagramma a vulcano, clustering gerarchico, previsioni delle classi oppure eseguire analisi personalizzate scrivendo propri script R.

All'interno dell'ambiente MPP, è inoltre possibile determinare l'identità chimica dei metaboliti eseguendo una ricerca del tempo di ritenzione o degli spettri nel database personalizzato dei composti METLIN o nella libreria metabolomica Agilent Fiehn GC-MS RTL. Inoltre, per ottenere dati in massa accurata, il browser ID è in grado di calcolare le formule empiriche tramite i dati spettrali. Tali formule possono essere combinate con i database di massa accurata per rendere l'identificazione dei composti più affidabile.



MPP è un software efficace, intuitivo, regolato dal flusso di lavoro e consente di combinare diversi tipi di esperimenti utilizzando una singola piattaforma.


Guided Workflow - Find Differential Expression (Step 5 of 8)
Steps
1. Summary Report
2. Experiment Grouping
3. QC on samples
4. Filter Probesets
5. Significance Analysis
6. Fold Change
7. GO Analysis
8. Find Significant Path...
Significance Analysis
Entities are filtered based on their p-values calculated from statistical analysis. To apply a new p-value cut-off, click on "Re-run Analysis" button. You will not be able to proceed to the next step if no entities pass the filter.
Displaying 4762 out of 13555 entities satisfying corrected p-value cut-off 0.05. To change, use the "Re-run Analysis" button below.
Differential Expression Analysis Report
Test Description
Selected Test : T Test unpaired
p-value computation: Asymptotic
Multiple Testing Correction: Benjamini-Hochberg
Result Summary
Volcano Plot
-log10(correctedPvalue)
log2(Fold change)
p-values
Select pair [Untreated] Vs [Treated]
Re-run Analysis
Help
<< Back
Next >>
Finish
Cancel

Il software MPP consente di comprendere meglio le differenze negli esperimenti GC-MS e LC-MS. Il software Mass Profiler Professional di Agilent comprende diversi strumenti analitici, come analisi di componenti principali, ANOVA, algoritmi di clustering e previsioni delle classi per trasformare in modo efficace ampie serie di campioni in informazioni chiare e rilevanti.

Analisi delle vie metaboliche

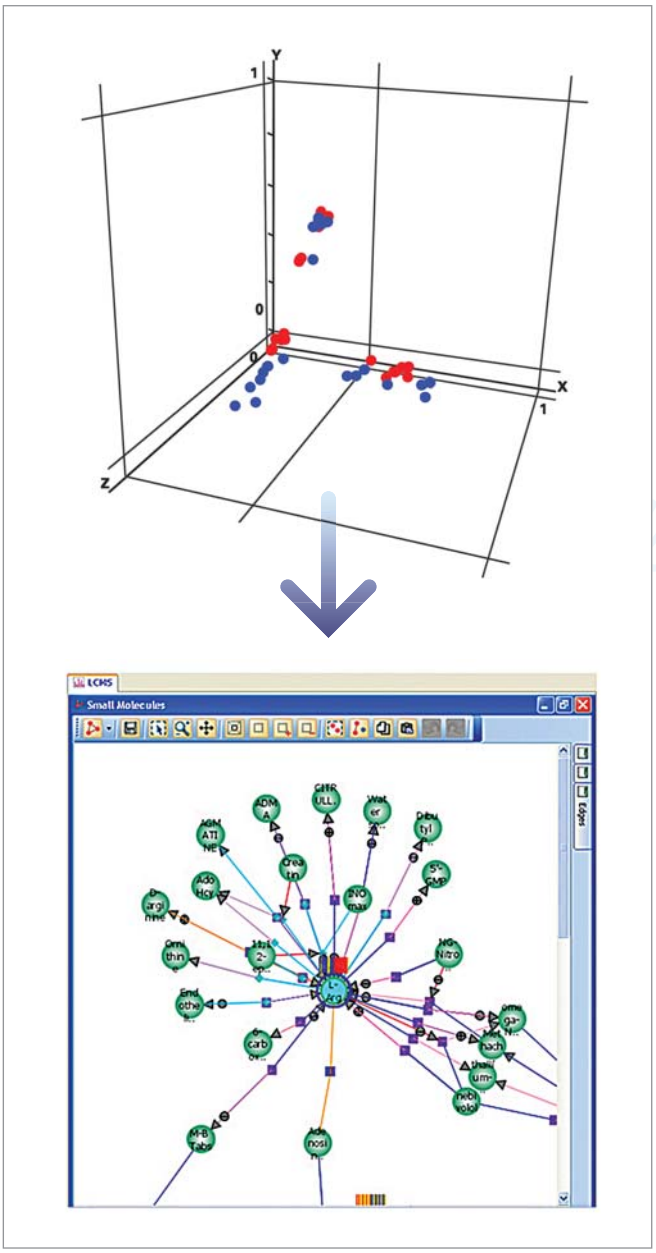
Sapere quale metabolita o proteina è responsabile delle differenze osservate non è sufficiente; è infatti necessario comprendere il contesto biologico. Il browser ID di MPP consente di utilizzare un modulo di percorso integrato e opzionale per esplorare i database interattivi di Agilent creati utilizzando l'elaborazione del linguaggio naturale della letteratura pubblicata. È possibile importare diversi percorsi formattati BioPax in cui eseguire ricerche tramite un elenco entità per determinare quelli che possono risultare importanti per l'esperimento biologico. Insieme al modulo, viene fornito un database di sinonimi di sostanze chimiche e proteine per semplificare l'esplorazione del percorso.

Integrazione della metabolomica

L'integrazione di dati "-omics" multipli semplifica la comprensione del comportamento globale dei sistemi biologici. I software biologici integrati di nuova generazione combinano GeneSpring GX e MPP per consentire di eseguire l'analisi dei dati genomici, trascrittomici, proteomici e metabolomici in una singola piattaforma. Grazie all'unificazione dei propri strumenti informatici, Agilent consente al ricercatore di lavorare in un singolo ambiente software utilizzando gli stessi strumenti di visualizzazione e analisi statistica per analizzare i diversi dati "-omics".

"L'identificazione dei composti è uno dei principali problemi nella metabolomica. Al fine di fronteggiare questo ostacolo, sono lieto di collaborare con Agilent Technologies allo sviluppo del database dei composti personali METLIN con la libreria spettrale MS-MS e spero di continuare questa collaborazione per sviluppare nuovi strumenti nell'ambito della metabolomica."

— Gary Siuzdak, Ph.D.,
Senior Director,
Scripps Center for Mass Spectrometry



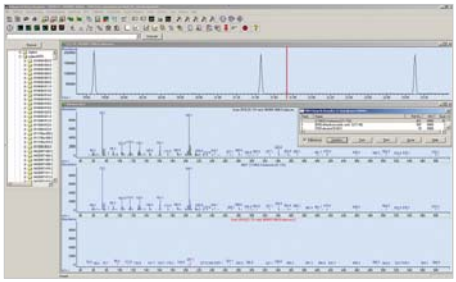
Il software MPP consente di confrontare diversi campioni e/o diverse piattaforme di analisi MS in un unico progetto. Il software rileva relazioni oltre al confronto a coppie negli esperimenti complessi e consente di eseguire un'interpretazione biologica attraverso l'analisi delle vie metaboliche.

La metabolomica di Agilent
Strumenti e software

Strumenti e software GC-MS

- **Sistema GC-MS serie 5975** – Singolo quadrupolo con la migliore sensibilità del settore per rivelare metaboliti a bassa concentrazione con una sorgente ionica chimicamente inerte per eliminare la degradazione dei metaboliti e una maggiore riproducibilità per risultati estremamente affidabili.

- **Sistema GC-MS triplo quadrupolo serie 7000** – Ideale per la metabolomica quantitativa/mirata, con sensibilità dell'ordine dei femtogrammi, consente di raggiungere i livelli di rivelazione e quantificazione più bassi, con selettività superiore e basso rumore e garantendo l'identificazione dei metaboliti a bassissima concentrazione; è dotato inoltre di una elevata velocità di acquisizione dati (fino a 500 transizioni al secondo).



- **Libreria metabolomica Agilent Fiehn GC-MS** – Sviluppata insieme al Dr. Oliver Fiehn, questa libreria specifica della metabolomica in continuo aggiornamento contiene indici consultabili relativi a tempo di ritenzione e spettri GC-MS EI riferiti a circa 700 metaboliti comuni. La libreria viene fornita insieme a metodi GC-MS preprogrammati completi e reportistica per analisi metabolomiche GC-MS al fine di ottenere risultati migliori. La libreria Agilent Fiehn viene integrata con gli altri strumenti software Agilent per consentire alla metabolomica GC-MS di consegnare le identità dei metaboliti più rapidamente ed espandere la conoscenza dei campioni dei metaboliti.

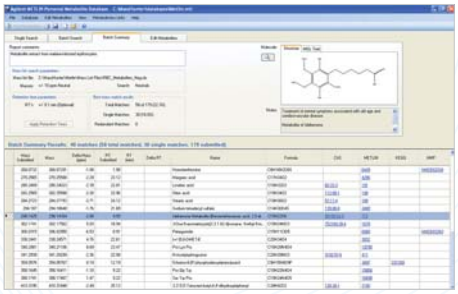
Strumenti e software LC-MS

- **Sistema serie 6200 TOF con massa accurata** – Ideale per la valutazione e l'identificazione dei componenti con basso peso molecolare, il sistema LC-MS 6200 TOF fornisce un'accuratezza di massa tipica di 1–2 ppm, una sensibilità a livello di attomoli in grado di garantire la rivelazione e l'identificazione anche dei composti a bassissima concentrazione, un range dinamico lineare di cinque ordini di intensità per una migliore soglia di rivelabilità su analiti target a livello di tracce anche in presenza di componenti più abbondanti, nonché velocità di acquisizione spettrale fino a 20 spettri al secondo per sfruttare le separazioni UHPLC utilizzando il sistema LC 1290 Infinity.

- **Sistema serie 6500 Q-TOF con massa accurata** – Dotato delle stesse funzioni del sistema LC-MS serie 6200 TOF descritto sopra, ma con la funzionalità MS-MS. L'accuratezza di massa tipica (2–4 ppm MS-MS) aumenta l'affidabilità dell'identificazione delle piccole molecole e riduce i falsi positivi quando si consultano i database. La velocità di acquisizione spettrale fino a 10 spettri MS-MS al secondo trae vantaggio dalle separazioni UHPLC utilizzando il sistema LC 1290 Infinity.

- **Sistema LC-MS serie 6400 a triplo quadrupolo** – La sensibilità a livello di sub-femtogrammi abilita la rivelazione di composti a bassa concentrazione. Con esperimenti MRM estremamente rapidi e prestazioni affidabili ed efficaci, il sistema LC-MS serie 6400 a triplo quadrupolo garantisce la massima produttività per analizzare ampie serie di campioni. Le ottiche ioniche comuni tra le piattaforme consentono inoltre di eseguire trasferimenti semplici da Q-TOF Agilent al triplo quadrupolo nel momento in cui si passa dalla scoperta alla convalida.

- **Libreria e database dei composti personali METLIN** – Integrato nei software MassHunter e MPP, il database dei composti personali METLIN contiene oltre 27.000 composti, tra cui 8.000 lipidi con tempi di ritenzione per più di 1.000 standard. Utilizzato con i dati TOF e Q-TOF, l'identificazione avviene tramite la ricerca all'interno del database di massa accurata e/o tempo di ritenzione. Una nuova funzionalità migliorata comprende l'opzione di ricerca nella libreria spettrale MS-MS con più di 3.000 composti al fine di ottenere un'identificazione più affidabile.



Documenti relativi

Metabolomics: Approaches Using Mass Spectrometry
(5990-4314EN)

Agilent Mass Profiler Professional Software
(5990-4164EN)

Integrated Biology from Agilent–The Future is Emerging
(5990-6047EN)

Per maggiori informazioni:

www.metabolomics-lab.com

Acquista online:

www.agilent.com/chem/store

Trova il centro assistenza clienti Agilent più vicino a te:

www.agilent.com/chem/contactus

Italia

numero verde 800 012 575
customercare_italy@agilent.com

Europa

info_agilent@agilent.com

Solo a scopo di ricerca. Le informazioni, le descrizioni e le specifiche contenute nella presente pubblicazione possono variare senza preavviso. Agilent Technologies non potrà essere ritenuta responsabile per eventuali errori contenuti nel presente documento o per danni incidentali o consequenziali connessi con la fornitura, l'applicazione o l'utilizzo del presente documento.

© Agilent Technologies. Inc. 2010
Pubblicato negli Stati Uniti, 10.09.10
5990-6048ITE

Agilent Technologies